

Chloride and stomatal conductance in coconut (1)

S. BRACONNIER and J. d'AUZAC (2)

Summary. — The effect of chloride deficiency on stomatal function and water balance of the coconut were analysed, using plantlets grown hydroponically and subjected to osmotic stress (-0.5 MPa). Stomatal movement were monitored using a porometer, and the associated ion movements studied with an electron microprobe. This revealed the existence of a transfert of K^+ and Cl^- ions from the lateral subsidiary cells to the guard cells. This movement plays a double role in stomatal opening since it simultaneously reduces lateral subsidiary cell turgor, and increases guard cell turgor. Under the conditions of our experiment, Cl^- deficiency leads, at the start of the day, to a three hour delay in stomatal opening. Under osmotic stress, Cl^- deficiency reduces stomatal opening and osmoregulation capacity of coconut. Water and osmotic potentials then become less negative, which leads to leaf turgor reduction. Cl^- deficient coconut is thus less drought tolerant.

Additional key words. — Electron probe, osmotic stress, osmoregulation, *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis*.

Abbreviations. PEG, polyethylene Glycol, Ψ_w , water potential, Ψ_o , osmotic potential; Ψ_t , turgor potential.

INTRODUCTION

Experimental proof of the importance for palms of chloride nutrition was obtained through agronomical research (Ollagnier and Ochs, 1971a and b; Daniel and Manciot, 1973; Margate *et al.*, 1979; Ollagnier *et al.*, 1983; von Uexkull, 1985). In coconut, chloride affects growth (von Uexkull, 1972; Oguis, 1979), yield (Magat *et al.*, 1975; de Taffin and Quencez, 1980), tolerance to some diseases such as *Helminthosporium* leafspot (Ollagnier *et al.*, 1983), *Pestalotiopsis* (Alonzo and Palomar, 1980), stem bleeding (Renard *et al.*, 1984) and lastly on drought tolerance. Cl^- deficiency leads to frond splitting (Pomier and de Taffin, 1982), whilst good chloride nutrition enables trees to maintain a higher number of green leaves during the dry season (Ollagnier *et al.*, 1983).

The basic physiological role played by chloride in these plants should be found. When leaves contain less than 0.25 % (dry weight) of Cl^- , coconut respond to fertilizers such as NaCl or KCl. It is the reason why some authors (von Uexkull, 1972; 1985) suggest that the element must have other functions than that of a cofactor (Warburg and Lüttgens, 1946; Theg and Homann, 1982; Coleman and Govindjee, 1987), or catalyst for enzymatic reactions (Rognes, 1980). They suppose that Cl^- ions play a major role in stomatal movements. In other plants many studies have in fact shown the role played by chloride in the reduction of the guard cell osmotic potential, which leads to stomatal opening (Raschke and Fellows, 1971; Raschke and Schnabl, 1978; Laffray and Louguet, 1982; Zeiger, 1983; Laffray *et al.*, 1984; Lasceve *et al.*, 1987). In certain plants such as *Allium cepa* which lacks functional chloroplasts in its guard cells (Fujino and Jinno, 1972), organic anion synthesis cannot electrically counterbalance the K^+ influx on stomatal opening. The presence of Cl^- is therefore essential to equilibrate K^+ ions and permit opening (Schnabl and Ziegler, 1977; Schnabl and Raschke, 1980). However, coconut stomata do not appear to be of onion type, since they have chloroplasts containing starch in their guard cells (Braconnier and d'Auzac, 1985).

The aim of this study is to shed some light on the role of Cl^- , studying the effects of deficiency on young coconuts under osmotic stress. Particular attention was given to its effect on stomatal and osmoregulation.

MATERIALS AND METHODS

Plant material.

We used the embryo technique to obtain chloride deficient coconut seedlings (*Cocos nucifera* L.). PB 121 hybrid embryos were isolated and cultured on a Cl^- -free agar medium (Braconnier, 1988). After a 6 month test tube culture, the plantlets were transferred on aerated culture solutions, some Cl^- -free and some not (Dufour and Schmitt, 1978; Braconnier, 1988), contained in 800 ml plastic vessels. The plantlets were grown in an air conditioned room, where the day time temperature was 30 °C and the night time temperature 24 °C, the relative humidity 70 % on day and 80 % at night, and the photoperiod 12 h (from 8 h a.m. to 8 h p.m.). Lighting was by 15 000 lux « daylight » fluorescent tubes. After an 8 month culture, Cl^- leaf contents were 0.066 and 1.820 % respectively for deficient and control plantlets.

Imposition of water stress.

Water stress was imposed using PEG 600. Two 4 % (v/v) applications of PEG 600, previously purified by passing through anionic (Dowex 2 \times 8) and cationic (Dowex 2 \times 50) resins, were made, one at time $T = 0$, and one at $T = 24$ h. The potential of the culture medium thus obtained was -0.5 MPa, and maintained till the end of the experiment which was conducted over 72 h. Four plants were studied simultaneously: two control plantlets (+ or $- Cl^-$) and two stressed plantlets (+ or $- Cl^-$). The experiment was replicated ten times.

Stomatal conductance.

Stomatal conductance was measured using a Delta T Mk 3 automatic porometer. For our plantlets, conductance was not uniform over the whole leaf surface. This is why each leaf studied was divided in three parts: basal, median and apical, for which stomatal conductance was measured. The

(1) Publié avec l'aimable autorisation de *Plant Physiol. Biochem.*

(2) Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France

mean of the three measurements was taken as the stomatal conductance of the leaf. Each point of the figure 2 represents the average of 10 leaf stomatal conductances. Standard deviation was about 15 %.

Water, osmotic and turgor potential.

Water (Ψ_w) and osmotic (Ψ_s) potential were measured using respectively Wescor L51 and Wescor L52 chambers, which were connected to a Wescor PR 55 psychrometer. For osmotic potential measurements, leaf fragments were taken and immediately frozen in liquid nitrogen. After thawing, they were compressed in order to extract cellular sap; this was collected on a sheet of blotting paper which was rapidly placed into the chamber. The measurement was obtained 2 h later, after the thermal balance has been reached. Turgor (Ψ_t) was deduced as a residual term according to the equation $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_t$. Results were statistically studied using a variance analysis.

Microanalysis.

Ion movements associated with stomatal opening were studied in stomatal complex of coconut and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Paradermal sections were taken at the end of the night (closed stomata) and after 4 h of light exposure (open stomata), fixed in isopentane chilled by liquid nitrogen, then freeze-dried. Sections were then carbon-coated and analysed with a CAMEBAX-type electron microprobe, using three wavelength dispersive detectors, enabling analysis of K, Cl and Mg. The operating conditions were 15 keV acceleration voltage, 19 nA beam current at the specimen level, 10 s monitoring time and 1 μ m spot diameter. The controls were orthose for K, apatite for Cl and olivine for Mg. Analysis were performed at the pole of lateral subsidiary cells, and at the center of other cells (Fig. 1). Each analysis was replicated six times, but only one measurement per stomatal complex was carried out. X-ray intensities were measured in 10 s counts. The results are expressed in counts

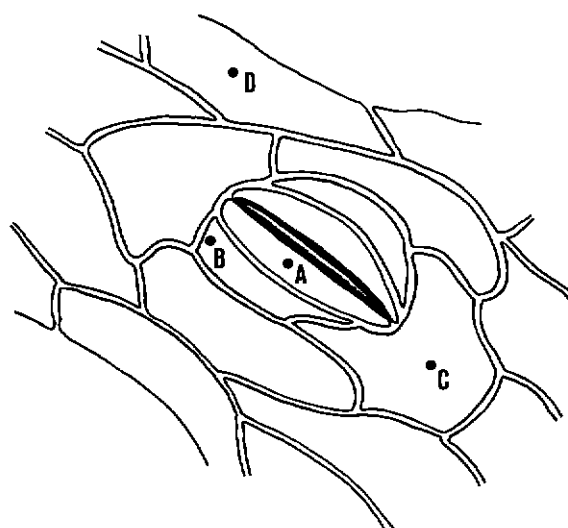


FIG 1 — Schematic diagram of the different zones studied by the electron microprobe on coconut and oil palm stomatal complex. A, guard cell, B, lateral subsidiary cell, C, polar subsidiary cell, D, epidermal cell — (Localisation schématique des différentes zones étudiées à la microsonde électronique sur le complexe stomatique du cocotier et du palmier à huile. A, cellule de garde, B, cellule subsidiaire latérale, C, cellule subsidiaire polaire, D, cellule épidermique).

per 10 s (peak minus back-ground), and in a variation percentage of X-ray emission intensities between closed and opened stomata.

RESULTS

Change in stomatal conductance when PEG is applied.

Results obtained were statistically treated using a variance analysis. Under our culture conditions, non-stressed plantlets conductance were low, around 0.5 cm s^{-1} (Fig. 2), possibly caused by insufficient lighting, which would mean that stomata open less than they would under natural conditions. However, stomatal conductance of Cl^{-1} deficient plantlets was significantly less ($p = 0.01$) than that of the $+\text{Cl}^{-}$ coconut, only during the first three hours of the photoperiod. Chloride deficiency led to delayed stomatal opening.

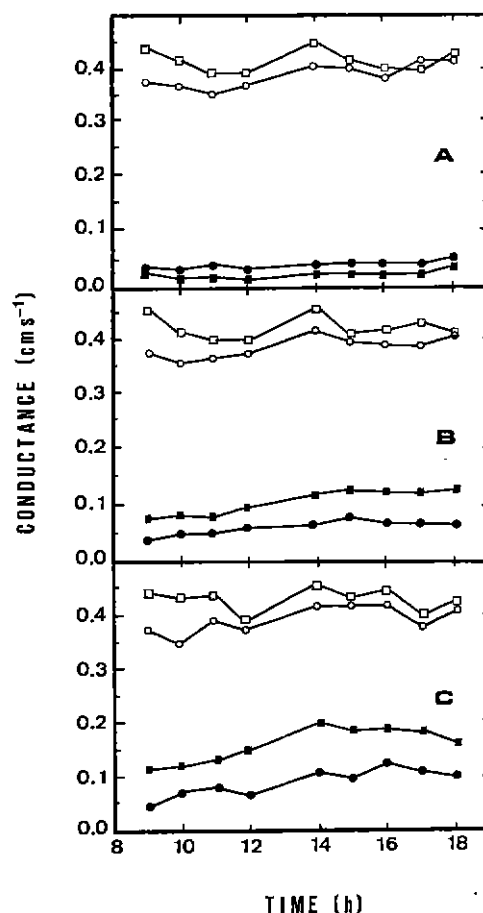


FIG. 2. — Daily changes in stomatal conductance of the four treatments during the first 3 days of the experiment. A, day 1, B, day 2, C, day 3 (○, ●), Cl^{-} deficient plantlets, (□, ■), non Cl^{-} deficient plantlets. Dark symbol, PEG stressed plantlets, open symbols, control — (Evolution journalière de la conductance stomatique pour les quatre traitements durant les trois premiers jours de l'expérience. A, jour 1; B, jour 2, C, jour 3. (○, ●) plantules carencées en Cl^{-} , (□, ■) plantules non carencées en Cl^{-} . Symboles noirs : plantules stressées au PEG, symboles clairs : témoins. Lumière (clair) et obscurité (noir) sont indiqués sur les figures).

The imposition of osmotic stress resulted in stomatal closure on the first day. This suggests that the drop of medium osmotic potential was too rapid, and led to stomatal closure. On the second day, conductance increased and continued to do so on the third day. This indicates that

coconut plantlets were adapting to stress. Conductance was significantly lower in Cl^- deficient plantlets than in non deficient ones. The latter seemed therefore to better adapt to osmotic stress than the formers. Under osmotic stress, chloride deficiency led to a stomatal conductance reduction

Ion movements associated with stomatal opening.

In table 1, the X-ray emission intensity and its variation percentage on opening are reported for each element studied. The variations percentages were low, compared with those noted in other species (Laffray and Louquet, 1982; Laffray *et al.*, 1984; Vavasour, 1984; Lascève *et al.*, 1987). This difference can be explained by insufficient lighting, and by the very thick cuticle of the two palmaceae. On stomatal opening, increase of K^+ and Cl^- guard cell contents was observed. The variation percentages were quite similar for oil palm and coconut. At the same time, K^+ and Cl^- content in lateral subsidiary cells fall. Therefore, a transfer of K^+ and Cl^- from lateral subsidiary cells to guard cells occurred at stomatal opening. These results confirmed a previous qualitative histological study (Braconier and d'Auzac, 1985). After PEG was applied, measurements taken on the third day of the experiment showed that reduction of stomatal conductance resulted from a drop in K^+ and Cl^- influx into guard cells (Table 2). In non Cl^- deficient plants, increase of K^+ and Cl^- guard cell contents were respectively + 60 and + 86 %. After 3 days of stress, these percentages had fallen to - 32 % for K^+ and + 24 % for Cl^- , whilst conductance value had a 60 % drop. Osmotic stress also led to significant losses of K^+ , Cl^- and Mg^{2+} in other cells. Some epidermal ions seemed to be redistributed to other tissues. This redistribution may participate to the osmoregulation phenomenon. In Cl^- deficient plants, stress resulted in a decrease in K^+ content of guard cells (from + 55 to + 26 %), whilst 70 % reduction in conductance was observed. Cl^- content and variation could not be detected.

TABLE II. — Variation percentages in X-ray emission intensity of K, Cl and Mg in coconut. Measurements were taken on the third day of the osmotic stress, at the end of the night and after four hours of light exposure — (*Pourcentages de variation de l'intensité des rayons X émis par K^+ , Cl^- et Mg^{2+} chez le cocotier. Les mesures ont été effectuées le troisième jour du stress hydrique, à la fin de la nuit et après quatre heures d'exposition à la lumière*)

		Variation percentage (<i>Pourcentage de variation</i>)			
		(+ Cl + PEG)		(+ Cl - PEG)	
		Control (<i>Témoin</i>)	Cl^- deficient (<i>Carence en Cl^-</i>)	Control (<i>Témoin</i>)	Cl^- deficient (<i>Carence en Cl^-</i>)
Guard cell	K	+ 60	+ 55	+ 32	+ 26
(<i>Cellule de garde</i>)	Cl	+ 86	—	+ 24	—
	Mg	+ 3	- 12	- 33	+ 11
Lateral cell	K	- 35	- 36	- 33	- 12
(<i>Cellule latérale</i>)	Cl	- 37	—	- 56	—
	Mg	- 3	+ 4	- 43	+ 4
Polar cell	K	- 4	+ 10	- 41	+ 15
(<i>Cellule polaire</i>)	Cl	- 35	—	- 42	—
	Mg	- 6	- 4	- 18	- 7
Epidermal cell	K	+ 9	- 5	- 23	- 10
(<i>Cellule épidermique</i>)	Cl	- 40	—	- 58	—
	Mg	- 24	- 10	- 38	- 14

Changes in water potential.

In non stressed plantlets, the water potential remained stable during the experiment, around - 0.38 MPa and - 0.47 MPa for - Cl^- and + Cl^- treatments respectively (Fig. 3A). The difference was not significant. Stress led to a

TABLE I. — Means of X-ray emissions of K^+ , Cl^- and Mg^{2+} measured in open and closed stomata of oil palm and coconut. Results expressed in counts per 10 s (peak minus background) — (*Moyennes des émissions de rayons X de K^+ , Cl^- et Mg^{2+} mesurées sur les stomates fermés et ouverts du palmier à huile et du cocotier. Les résultats sont exprimés en nombre de coups en 10 s-pics moins le bruit de fond*)

		Oil palm (<i>Palmier à huile</i>)			Coconut (<i>Cocotier</i>)		
		Closed stomata (<i>Stomates fermés</i>)	Open stomata (<i>Stomates ouverts</i>)	Diff. (%)	Closed stomata (<i>Stomates fermés</i>)	Open stomata (<i>Stomates ouverts</i>)	Diff. (%)
Guard cell	K	186 ± 43	287 ± 27	+ 54	241 ± 47	385 ± 54	+ 60
(<i>Cellule de garde</i>)	Cl	134 ± 32	241 ± 30	+ 80	63 ± 21	117 ± 16	+ 86
	Mg	90 ± 20	97 ± 19	+ 8	32 ± 9	33 ± 9	+ 3
Lateral cell	K	236 ± 26	179 ± 32	- 24	232 ± 39	150 ± 45	- 35
(<i>Cellule latérale</i>)	Cl	180 ± 31	109 ± 23	- 39	120 ± 28	75 ± 11	- 37
	Mg	116 ± 35	113 ± 26	- 3	32 ± 6	31 ± 9	- 3
Polar cell	K	216 ± 42	255 ± 59	+ 18	97 ± 36	93 ± 28	- 4
(<i>Cellule polaire</i>)	Cl	172 ± 50	178 ± 18	+ 3	51 ± 9	33 ± 7	- 35
	Mg	194 ± 49	178 ± 18	- 8	16 ± 5	15 ± 5	- 6
Epidermal cell	K	208 ± 6	264 ± 70	+ 27	284 ± 70	310 ± 60	+ 9
(<i>Cellule épidermique</i>)	Cl	154 ± 36	171 ± 56	+ 11	95 ± 24	57 ± 10	- 40
	Mg	138 ± 33	144 ± 26	+ 4	75 ± 15	57 ± 12	- 24

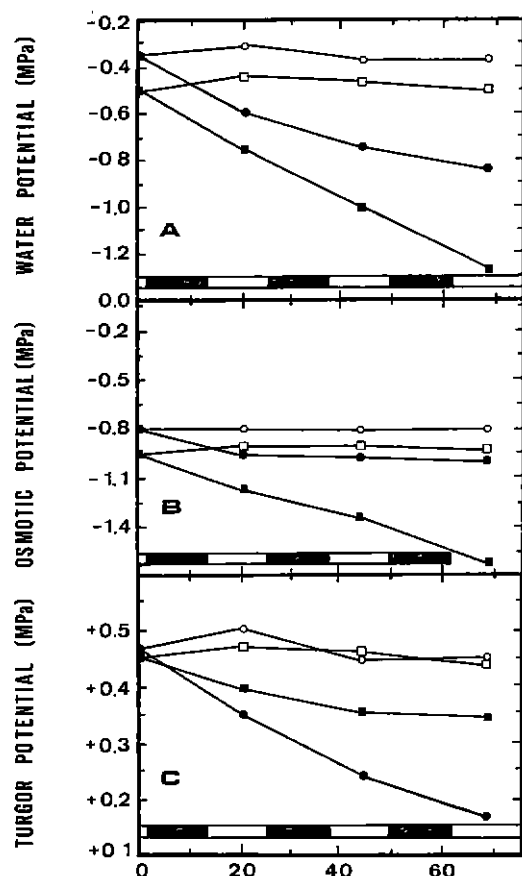


FIG 3. — Changes of water (A), osmotic (B) and turgor (C) potentials during the experiment. (○, ●), Cl⁻ deficient plantlets, (□, ■), non Cl⁻ deficient plantlets. Dark symbols, PEG stressed plantlets; open symbols, control. Dark (black) and light (white) periods are indicated on the figures — (Variations des potentiels hydrique (A), osmotique (B) et de turgescence (C) durant l'expérimentation (○, ●), plantules carencées en Cl⁻; (□, ■), plantules non carencées en Cl⁻. Symboles noirs, plantules stressées au PEG, symboles clairs, témoins. Lumière (clair) et obscurité (noir) sont indiquées sur les figures).

marked decrease in Ψ_w . The reduction was however more significant in + Cl⁻ treatment than in Cl⁻ deficient plantlets. The minimum values reached were -0.83 and -1.32 MPa respectively for + Cl⁻ and - Cl⁻ treatment. The latters were thus capable, in response to an osmotic stress, of increasing their Ψ_w more significantly than the formers.

Changes in osmotic potentials.

In non stressed plants, difference in osmotic potential between + Cl⁻ treatment (-0.93 MPa mean) and - Cl⁻ plantlets (-0.81 MPa mean) was not significant (Fig. 3 B). Osmotic stress resulted in lowering values. The drop is much more significant in the non deficient coconut (from -0.93 to -1.63 MPa) than in the Cl⁻ deficient plantlets (from -0.81 to -1 MPa). Moreover, regarding the trend of the curves, osmotic potential of deficient plantlets rapidly reached a minimum level, whilst that of non deficient coconut could continue to decrease suggesting that the latters were somewhat slow to reestablish their water balance. The Cl⁻ deficient coconut plantlets were therefore probably much less capable of accumulating osmotica than non deficient plantlets.

Changes in turgor potentials.

In non-stressed plants, the mean turgidity was +0.47 MPa for the two treatments (Fig. 3 C). Stress led to

reduction in values, which was more significant in - Cl⁻ than in + Cl⁻ treatment. After 69 h of stress, Ψ_t of + Cl⁻ plantlets showed a 24 % decrease (from +0.46 to +0.35 MPa), whilst in - Cl⁻ treatment, Ψ_t dropped by 64 % (from +0.47 to +0.17 MPa). Under an osmotic stress, chloride deficient coconuts lost their turgidity more rapidly than the non deficient plantlets.

DISCUSSION

This greenhouse study enabled us to confirm the importance of chloride ion in coconut mineral nutrition. Under non-stressed conditions, stomatal opening was accompanied by a movement of potassium and chloride from lateral subsidiary cells to guard cells, as was observed in maize (Raschke and Fellows, 1971). In Cl⁻ deficient plantlets, the absence of Cl⁻ influx into guard cells was balanced by another mechanism, yet to be determined. The latter, however, acted more slowly, since it took 3 h of light exposure before conductances were the same in both treatments. Cl⁻ deficiency led to a reduction in gas exchanges during the first three hours.

The imposition of osmotic stress resulted in stomatal closure on the first day (Fig. 2). Such closure would never happen in the fields, because water stress under natural conditions is more progressive. Here, it was certainly caused by hydropassive water movements (Falk, 1966). On day 2 and 3, reopening was observed, more significant in + Cl⁻ plantlets. Under osmotic stress, chloride deficiency had a depressive effect on stomatal conductance throughout the day, which probably led to a marked reduction in photosynthetic gas exchanges.

Osmotic stress also led to a reduction in leaf water potential, more marked in + Cl⁻ plantlets than in Cl⁻ deficient ones. This reduction was due to a fall in osmotic potential values. The Ψ_s of Cl⁻ deficient coconuts reached a -1 MPa minimum value, and a further reduction seemed impossible. However, the non-deficient coconuts dropped their Ψ_s to -1.6 MPa, and seemed able to reach even lower figures (Fig. 3). In response to relatively moderate osmotic stress (-0.5 MPa), non-deficient coconuts accumulated more osmotica than the Cl⁻ deficient plantlets. As a result, + Cl⁻ plantlets were better able to maintain tissue turgidity. Thus, after 3 days stress, non-deficient coconut turgidity still represented 76 % of its original figure, whilst in - Cl⁻ treatment, it only represented 36 % (Fig. 3); turgidity was not, however totally lost (+0.15 MPa). Chloride deficiency thus led to a significant reduction in osmoregulation capacity of coconut, whilst the maintenance of cellular turgidity is considered as the major factor for the continuation of growth and production in water stress periods (Turner and Jones, 1980; Turner, 1986). A better osmoregulation could explain the more significant stomatal reopening observed on day 2 and 3, in the + Cl⁻ plantlets.

Chloride deficiency thus operated on at least two levels: (a) as regards stomatal regulation, it caused delayed opening at the start of the day. Under osmotic stress, it led to reduced stomatal conductance, (b) it reduced the osmoregulation capacity of coconut.

Chloride ion seems to play an important role in osmotic stress tolerance in coconut. Through its effect on conductance and osmoregulation, it may enable coconut to optimise the transpiration-assimilation balance. This is an argument for some results obtained in the fields (Braconnier and d'Auzac, 1989). The question is how chloride affects osmoregulation: (a) does it act via stomatal opening, by permit-

ting photosynthesis and thus production of osmotica ? (b) is it an osmoticum by itself ? (c) is it essential for certain enzymatic reaction(s) enabling a synthesis of osmotica ?

Acknowledgements. — We should like to thank the Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO), which

financed our research, and La Me research station (IRHO, Côte-d'Ivoire) for supplying in vitro coconut plantlets. We should also thank Mr. Merlet, engineer in the Joint U.S.T.L. Microanalysis Services, for his cooperation whilst we used the Camebax microprobe. We are grateful to Dr. D. Laffray for his constructive criticism of the manuscript.

REFERENCES

- [1] ALONZO J. C. and PALOMAR M. K. (1980) — Effect of seawater and seaweed salt on coconut gray leaf spot disease *Phil. J. Coco. Stud.* **5**, 27-31.
- [2] BRACONNIER S. (1988) — Physiologie de la nutrition en chlorure chez le Palmier à huile et le Cocotier *Thèse Doct.*, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- [3] BRACONNIER S. et D'AUZAC J. (1989). — Effet d'une carence en chlorure au champ chez le Cocotier hybride PB 121 *Oléagineux*, **44**, in press.
- [4] BRACONNIER S. et D'AUZAC J. (1985) — Etude anatomique et mise en évidence cytologique des mouvements de potassium et de chlore associés à l'ouverture des stomates de Palmier à huile et de Cocotier. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **301**, série III, 457-462.
- [5] COLEMAN W. J. et GOVINDJEE (1987). — A model for the mechanism of chloride activation of oxygen evolution in photosystem II *Photosynth. Res.*, **13**, 199-223.
- [6] DANIEL C. et MANCIOT R. (1973) — La nutrition en chlore des jeunes cocotiers aux Nouvelles-Hébrides *Oléagineux*, **28**, 771-772.
- [7] DUFOUR F. et SCHMITT G. (1978). — Techniques de culture en solution du Palmier à huile et du Cocotier *Oléagineux*, **33**, 485-489.
- [8] ESCHBACH J. M., MASSIMINO D. and MENDOZA A. M. R. (1982). — Effet d'une carence en chlore sur la germination, la croissance et la photosynthèse du Cocotier. *Oléagineux*, **37**, 115-125.
- [9] FALK S. O. (1966). — Effect on transpiration and water uptake by rapid changes in osmotic potential of nutrient solution *Physiol. Plant*, **19**, 602-617.
- [10] FUJINO M. and JINNO N. N. (1972) — The fine structure of the guard cell of *Allium cepa* L. *Sci. Bull. Fac. Educ. Nagasaki Univ.*, **24**, 53-59.
- [11] LAFFRAY D. and LOUGUET P. (1982). — Microanalytical studies of potassium and chloride fluxes and stomatal movement of two species: *Vicia faba* L. and *Pelargonium × hortorum*. *J. Exp. Bot.*, **33**, 771-782.
- [12] LAFFRAY D., VAVASSEUR A., GARREC J. P. and LOUGUET P. (1984). — Effect of high carbon dioxide pressure on stomatal movements and related ion fluxes in *Pelargonium hortorum* and *Vicia faba*. Electron probe studies *Physiol. Vég.*, **22**, 851-857.
- [13] LASCÈVE G., COUCHAT P., VAVASSEUR A. and BOSSY J. P. (1987). — Changes in K^+ , Cl^- and P contents in stomata of *Zea mays* leaves exposed to different light and CO_2 levels. *Physiol. Plant*, **9**, 709-715.
- [14] MAGAT S. S., CADIGAL V. L. and HABANA J. A. (1975) — Yield improvement of coconut in elevated area of Davao (Philippines) by KCl fertilization. *Oléagineux*, **30**, 413-418.
- [15] MARGATE R. Z., MAGAT S. S., ALFORJA L. M. and HABANA J. A. (1979). A long-term KCl fertilization study of bearing coconuts in an inland-upland area of Davao (Philippines) *Oléagineux*, **34**, 235-240.
- [16] OGUI S. L. G., MAGAT S. S. and MARGATE R. Z. (1979) — The effect of chlorine sources and ammonium sulfate on the growth of coconut seedlings. *Phil. J. Coco. Stud.*, **14**, 25-29.
- [17] OLLAGNIER M. et OCHS R. (1971a) — Le chlore, nouvel élément essentiel dans la nutrition du Palmier à huile. *Oléagineux*, **26**, 1-15.
- [18] OLLAGNIER M. et OCHS R. (1971b) — La nutrition en chlore du Palmier à huile et du Cocotier *Oléagineux*, **26**, 367-372.
- [19] OLLAGNIER M., OCHS R., POMIER M. et DE TAFFIN G. (1983) — Action du chlore sur le Cocotier hybride PB-121 en Côte-d'Ivoire et en Indonésie. Développement, tolérance à la sécheresse, production *Oléagineux*, **38**, 309-321.
- [20] POMIER M. et DE TAFFIN G. (1982). — Tolérance à la sécheresse de quelques hybrides de Cocotiers *Oléagineux*, **37**, 55-62.
- [21] RASCHKE K. and FELLOWS M. P. (1971). — Stomatal movement in *Zea mays*. shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells. *Planta*, **101**, 296-316.
- [22] RASCHKE K. and SCHNABL H. (1978) — Availability of chloride affects balance between potassium and chloride malate in guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.*, **62**, 84-87.
- [23] RENARD J. L., BRAHMANA D. et ROGNON F. (1984). — Comportement du Cocotier hybride Nain Jaune × Grand Ouest Africain vis-à-vis du Stem bleeding en Indonésie. Mise en évidence du rôle du chlore dans l'expression des symptômes. *Oléagineux*, **39**, 311-319.
- [24] ROGNES S. E. (1980) — Anion regulation of lupin asparagine synthetase: chloride activation of the glutamine-utilizing reaction *Phytochemistry*, **19**, 2287-2293.
- [25] SCHNABL H. and RASCHKE K. (1980) — Potassium chloride as stomatal osmoticum in *Allium cepa* L., a species devoid of starch in guard cells. *Plant Physiol.*, **65**, 8-93.
- [26] SCHNABL H. and ZIEGLER H. (1977) — The mechanism of stomatal movement in *Allium cepa* L. *Planta*, **136**, 37-43.
- [27] TAFFIN G. DE et QUENCEZ P. (1980). — Aspect de la nutrition anionique chez le Palmier à huile et le Cocotier. Problème du chlore *Oléagineux*, **35**, 539-544.
- [28] THEG S. M. and HOMANN P. H. (1982) — Light-, pH, uncoupler-dependent association of chloride with chloroplast thylakoids *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 221-234.
- [29] TURNER N. C. (1986) — Adaptation to water deficit: a changing perspective *Aust. J. Plant Physiol.*, **13**, 175-190.
- [30] TURNER N. C. and JONES M. M. (1980) — Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. In *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Turner N. C. and Kramer P. J., ed., Wiley and Sons, 87-103.
- [31] VON UEXKULL H. R. (1972). — Response of coconut to (potassium) chloride in the Philippines. *Oléagineux*, **27**, 13-19.
- [32] VON UEXKULL H. R. (1985) — Chlorine in the nutrition of palm trees. *Oléagineux*, **40**, 67-74.
- [33] VAVASSEUR A. (1984). — Microanalyse des éléments minéraux de l'épiderme foliaire, variations de leur teneur associées aux mouvements stomatiques. *Thèse Doct. Etat*, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, Grenoble.
- [34] WARBURG G. O. and LÜTTGENS W. (1946) — Photochemische Reduktion der Chinone in grünen Zellen und Granula. *Biochemica*, **11**, 321-322.
- [35] ZEIGER E. (1983) — The biology of stomatal guard cells *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **34**, 441-475.

RÉSUMÉ

Chloride and stomatal conductance in coconut.

S. BRACONNIER et J. D'AUZAC, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 6, p. 259-266.

Les effets d'une carence en chlorure sur le fonctionnement stomatique et sur l'équilibre hydrique du Cocotier ont été analysés sur des plantules cultivées en hydroponie et soumises à un stress osmotique ($-0,5$ MPa). Les mouvements stomatiques ont été suivis au poromètre, et les mouvements d'ions associés étudiés au moyen d'une microsonde électronique. On a mis en évidence l'existence d'une navette de K^+ et Cl^- des cellules subsidiaires latérales vers les cellules de garde. Ce mouvement a un double rôle à l'ouverture stomatique, puisque, simultanément, il réduit la turgescence des cellules subsidiaires latérales et augmente la turgescence des cellules

RESUMEN

Ion de cloro y conductancia de estomas en el cocotero.

S. BRACONNIER y J. D'AUZAC, *Oléagineux*, 1990, **45**, N° 6, p. 259-266.

Los efectos de una carencia de cloruro en el funcionamiento de los estomas y en el equilibrio hídrico del cocotero se analizaron en plántulas cultivadas en forma hidropónica y sometidas a un stress osmótico ($0,5$ MPa). Los movimientos estomáticos se siguieron con porómetro y los movimientos de iones asociados se estudiaron con microsonda electrónica. Se ha logrado evidenciar la existencia de un vaivén de K^+ y Cl^- de células subsidiarias laterales hacia las células de guardia. Este vaivén tiene un doble papel en la apertura estomática, ya que al mismo tiempo reduce la turgencia de las células subsidiarias laterales y aumenta la turgencia de las células de

de garde. Dans nos conditions, la carence en Cl^- entraîne au niveau stomatique un retard à l'ouverture d'environ 3 h en début de journée. En cas de contrainte hydrique, la carence entraîne chez le Cocotier une réduction de l'ouverture stomatique et une diminution de la capacité d'osmorégulation. Les potentiels hydriques et osmotiques prennent des valeurs moins négatives aboutissant à une diminution de la turgescence foliaire. Le Cocotier carencé en Cl^- a ainsi une moins bonne aptitude à tolérer les déficits hydriques.

guardia Dentro de las presentes condiciones, la carencia de Cl^- acarrea un retraso de la apertura de unas 3 horas a principios del día. En caso de limitación de agua, la carencia produce en el cocotero una reducción de la apertura estomática y una disminución de la capacidad de osmo-regulación. Los potenciales hídricos y osmóticos toman entonces valores no tan negativos, que resultan en una disminución de la turgencia foliar. Eso trae para el cocotero con carencia de Cl^- una habilidad no tan buena para tolerar los déficits hídricos.

L'ion chlore et la conductance stomatique chez le cocotier

S. BRACONNIER et J. D'AUZAC (1)

INTRODUCTION

La preuve expérimentale de l'importance de la nutrition en chlorure chez les Palmacées a été acquise grâce aux résultats de la recherche agronomique (Ollagnier et Ochs, 1971a et b; Daniel et Manciot, 1973; Margate *et al.*, 1979; Ollagnier *et al.*, 1983; von Uexkull, 1985). Chez le cocotier, l'ion chlorure intervient sur la croissance (von Uexkull, 1972; Ogus, 1979), la production (Magat *et al.*, 1975; de Taffin et Quencez, 1980), la tolérance à certaines maladies comme l'helminthosporiose (Ollagnier *et al.*, 1983), le Pestalotiopsis (Alonzo et Palomar, 1980), le « stem bleeding » (Renard *et al.*, 1984) et enfin sur la tolérance à la sécheresse, une carence en Cl^- entraîne des cassures de palmes (Pomier et de Taffin, 1982), alors qu'une bonne nutrition chlorée permet aux arbres, pendant la saison sèche de garder un nombre de feuilles vertes plus élevé (Ollagnier *et al.*, 1983).

Il convient de définir les bases du rôle physiologique du chlorure chez ces plantes. Lorsque les feuilles contiennent moins de 0,25 % du poids sec de Cl^- les cocotiers répondent à des fumures telles NaCl ou KCl, c'est pourquoi certains auteurs (von Uexkull, 1972, 1985) supposent que cet élément doit avoir d'autres fonctions que celles de cofacteur (Warburg et Lüttgens, 1946; Theg et Homann, 1982; Coleman et Govindjee, 1987), ou de catalyseur de réactions enzymatiques (Rognes, 1980). Ils supposent que les ions Cl^- joueraient un rôle capital dans le mouvement stomatique. De nombreux travaux ont en effet mis en évidence chez d'autres plantes, la participation du chlorure dans l'abaissement du potentiel osmotique des cellules de garde, qui conduit à l'ouverture stomatique (Raschke et Fellows, 1971; Raschke et Schnabl, 1978; Laffray et Louguet, 1982; Zeiger, 1983; Laffray *et al.*, 1984; Lascève *et al.*, 1987). Chez certaines plantes comme l'oignon, *Allium cepa*, les chloroplastes fonctionnels sont absents des cellules de garde (Fujino et Jinno, 1972), ainsi, à l'ouverture stomatique, l'influx de potassium dans les cellules de garde ne pourrait être contrebalancé électriquement par une synthèse d'anions organiques. La présence de Cl^- est alors indispensable pour compenser les ions K^+ , et permettre l'ouverture (Schnabl et Zeigler, 1977; Schnabl et Raschke, 1980). Cependant, les stomates de cocotier ne sont apparemment pas du type oignon, car ils possèdent dans leurs cellules de garde des chloroplastes contenant de l'amidon (Braconnier et d'Auzac, 1985).

L'objectif de ce travail est d'apporter quelques éclaircissements sur le rôle du Cl^- , en étudiant les effets de sa carence sur de jeunes cocotiers soumis à un stress hydrique. Les effets sur la régulation stomatique et l'osmorégulation ont été particulièrement pris en compte dans ce travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal.

Nous avons utilisé la technique de culture d'embryons de cocotier (*Cocos nucifera* L.) pour obtenir des plantules carencées en Cl^- . Des

embryons d'hybride PB 121 ont été isolés et mis en culture sur un milieu nutritif gélosé dépourvu de Cl^- (Braconnier, 1988). Après 6 mois de culture en tube, les plantules ont été transférées dans des solutions nutritives aérées avec ou sans chlorures (Dufour et Schmitt, 1978; Braconnier 1988), contenues dans des vases en matière plastique d'un volume de 800 ml. Les plantules ont été cultivées dans une salle climatisée, où la température était de 30 °C le jour et 24 °C la nuit, l'humidité relative de 70 % le jour et 80 % la nuit, et la photopériode de 12 h (de 8 h à 20 h). L'éclairage est assuré par des tubes néon « lumière du jour », produisant un éclairage de 15 000 lux.

Après huit mois de culture, les teneurs foliaires en Cl^- étaient de 0,066 % et 1,820 % respectivement pour les plantules carencées et pour les témoins.

Application d'un stress hydrique.

Le stress hydrique a été obtenu par apport de PEG 600 (Poly Ethylene Glycol). Deux apports de 4 % (V/V) de PEG 600 préalablement purifié par passage sur résine anionique (Dowex 2 × 8) et cationique (Dowex 2 × 50) ont été réalisés, l'un au temps $T = 0$, et l'autre à $T = 24$ h. Le potentiel de la solution nutritive ainsi obtenue est de $-0,5$ MPa. L'expérimentation a été conduite pendant 72 h.

Quatre plantes étaient étudiées simultanément : deux plantules témoins (+ ou $-\text{Cl}^-$), et deux plantules stressées ($+$ ou $-\text{Cl}^-$). L'expérimentation a été répétée dix fois.

Conductance stomatique.

Les mesures de la conductance stomatique (G) ont été faites avec un poromètre automatique Delta T modèle MK III. Sur nos plantules, la conductance n'était pas constante sur toute la surface foliaire. C'est pourquoi chaque feuille étudiée a été divisée en trois parties : basale, médiane, et apicale, sur lesquelles la conductance stomatique a été mesurée. La moyenne des trois mesures a donné la conductance stomatique de la feuille.

Chaque point de la figure 2 représente la moyenne de la conductance stomatique de 10 feuilles. L'écart-type était d'environ 15 %.

Potentiel hydrique, osmotique, de turgescence.

Les mesures des potentiels hydriques (Ψ_w) et osmotiques (Ψ_s) ont été obtenues au moyen d'un psychromètre Wescor PR 55, équipé de chambres psychrométriques pour feuilles Wescor L 51 (Ψ_w) et Wescor L 52 (Ψ_s).

Pour les mesures de potentiel osmotique, des fragments foliaires ont été prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Après décongélation, ils ont été comprimés afin d'en extraire le suc cellulaire ; lequel a été recueilli sur un morceau de papier buvard rapidement introduit dans la chambre de mesure. Après avoir laissé pendant deux heures l'équilibre thermique s'établir, la mesure a été faite.

Le potentiel de turgescence (Ψ_t) a été déduit comme un terme résiduel en accord avec la relation :

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_t$$

L'étude statistique des résultats a été faite par analyse de variance.

(1) Laboratoire de physiologie végétale appliquée - Case 065 - Place Eugène-Bataillon 34095 Montpellier Cedex 5

Microanalyse.

Nous avons étudié les mouvements d'ions, dans le complexe stomatique, associés à l'ouverture chez le cocotier et le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Des lambeaux d'épiderme inférieur ont été prélevés en fin de nuit (stomates fermés) et après quatre heures d'éclairement (stomates ouverts), fixés dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide, puis lyophilisés pendant 48 h. Enfin, ils ont été carbonés avant d'être analysés à la microsonde électronique de type CAMEBAX, utilisant trois détecteurs à dispersion de longueur d'onde permettant de doser trois éléments : K, Cl et Mg. La tension d'accélération était de 15 KeV, l'intensité du courant du faisceau au niveau de l'échantillon de 19 nA, le temps de comptage de 10 s et la taille du spot de 1 μ m de diamètre. Les témoins étaient de l'orthose pour K, de l'apatite pour Cl, et l'olivine pour Mg.

L'analyse a été effectuée à l'extrémité distale des cellules de garde, et au centre pour les autres cellules (Fig. 1). Chaque analyse était répétée six fois mais une seule mesure a été effectuée par complexe stomatique. Les intensités des émissions de rayons X sont mesurées durant 10 s. Les résultats sont donnés en nombre de coups en 10 s (pics moins le bruit de fond) et sous forme de pourcentage de variation de l'intensité des différentes émissions X, entre les valeurs mesurées lorsque les stomates sont fermés, puis ouverts.

RÉSULTATS

Evolution de la conductance stomatique lors de l'application du PEG.

Les résultats obtenus ont été traités par analyse de variance. Dans nos conditions de culture, les valeurs des conductances des plantules non stressées sont faibles et proches de 0,5 cm s⁻¹ (Fig. 2), ce qui peut s'expliquer par un éclairage insuffisant, qui entraîne une ouverture stomatique plus réduite que dans les conditions naturelles. Cependant, la conductance stomatique des plantules - Cl⁻ est significativement plus faible ($p = 0,01$) que celle des plantules + Cl⁻, pendant les trois premières heures de la photopériode seulement. La carence en chlorure paraît responsable d'un retard à l'ouverture stomatique.

L'application du stress hydrique provoque la fermeture des stomates au premier jour. Cela laisse supposer que l'abaissement du potentiel osmotique de la solution nutritive est trop rapide et conduit à la fermeture des stomates. Dès le second jour, on note une augmentation des conductances qui se poursuit au troisième jour, laquelle traduit logiquement une adaptation du cocotier au stress. La conductance des plants carencés en Cl⁻ est significativement plus faible que celle des plants non carencés. Donc ces derniers ont une meilleure adaptation que les premiers.

La carence en chlorure provoque, chez le cocotier subissant une contrainte hydrique, une diminution de la conductance stomatique.

Mouvements d'ions associés à l'ouverture stomatique.

L'intensité d'émission de rayons X et son pourcentage de variation à l'ouverture sont reportés au tableau I pour chaque élément. Les pourcentages de variation à l'ouverture étaient relativement faibles dans les cellules de garde par rapport à ceux enregistrés chez d'autres espèces (Laffray et Louguet, 1982 ; Laffray *et al.*, 1984 ; Vavasseur, 1984 ; Lascève *et al.*, 1987). Cette différence peut s'expliquer par l'insuffisance de l'éclairage et par la cuticule très épaisse des *Palmaceae*. A l'ouverture stomatique, on observe un accroissement des teneurs en K⁺ et Cl⁻ dans les cellules de garde. Chez le palmier et le cocotier, les variations de pourcentage sont de même ordre. On relève simultanément une baisse des teneurs en K⁺ et Cl⁻ dans les cellules subsidiaires latérales. Il existe donc un transfert de K⁺ et Cl⁻, des cellules subsidiaires latérales vers les cellules de garde. Ces résultats confirment une précédente étude histologique qualitative (Braconnier et d'Auzac, 1985).

Après l'application du PEG, les mesures effectuées au troisième jour d'expérimentation montrent que la diminution de la conductance stomatique résulte d'une baisse de l'influx de K⁺ et Cl⁻ dans les cellules de garde (Tabl. II).

Chez les plants non carencés en Cl⁻, l'augmentation des teneurs en ions K⁺ et Cl⁻ lors de l'ouverture stomatique est, chez le ténor de + 60 % pour K⁺ et + 86 % pour Cl⁻. Après trois jours de stress, ces pourcentages ne sont plus que de + 32 % pour K⁺ et + 24 % pour Cl⁻ alors que la réduction de la conductance est de 60 %. Le stress hydrique entraîne également des pertes importantes en K⁺, Cl⁻ et Mg²⁺ dans les autres cellules. Il semble qu'une partie des ions contenus dans le tissu épidermique soit redistribuée vers d'autres tissus. Cette redistribution peut participer au phénomène d'osmorégulation.

Chez les plants carencés en Cl⁻, le stress provoque une diminution des teneurs en K⁺ des cellules de garde (de + 55 % à + 27 %) et une réduction de la conductance stomatique de 70 %. La teneur en Cl⁻ et ses variations ne sont pas mesurables.

Evolution du potentiel hydrique.

Chez les plantules non stressées, le potentiel hydrique est stable au cours de l'expérimentation, et se situe en moyenne à - 0,38 MPa et - 0,47 MPa respectivement pour les traitements - Cl⁻ et + Cl⁻ (Fig. 3). La différence n'est pas significative. Le stress provoque une diminution considérable des Ψ_w . La baisse est cependant plus importante pour le traitement + Cl⁻ que pour le traitement - Cl⁻. Les valeurs minimales atteintes sont de - 0,83 MPa pour les plants - Cl⁻ et - 1,32 MPa pour les cocotiers + Cl⁻. Les plants non carencés sont donc capables, en réponse à une contrainte hydrique, d'augmenter leur Ψ_w de manière plus importante que les cocotiers carencés en chlorure.

Evolution du potentiel osmotique.

Chez les plants non stressés, la différence de potentiel osmotique entre le traitement + Cl⁻ (0,93 MPa en moyenne) et - Cl⁻ (- 0,81 MPa) n'est pas significative (Fig. 3). Le stress hydrique entraîne une baisse des valeurs. La chute est nettement plus importante pour le traitement + Cl⁻ (de - 0,93 MPa à - 1,63 MPa) que pour le traitement - Cl⁻ (de - 0,81 MPa à - 1 MPa). De plus, compte tenu de l'allure des courbes, le potentiel osmotique des plants carencés atteint rapidement un niveau minimal, alors que celui des plantules non carencées pourrait continuer à décroître, ceci laisse à penser à une certaine lenteur des cocotiers non carencés à rétablir leur équilibre hydrique. Les plantules de cocotier carencées en Cl⁻ ont donc probablement une capacité à accumuler les osmotites très inférieure à celle des plantules non carencées.

Evolution du potentiel de turgescence.

La turgescence des plants non stressés est en moyenne de + 0,47 MPa, pour les deux traitements (Fig. 3). Le stress provoque une baisse des valeurs, qui est plus importante chez les plants - Cl⁻ que chez les plants + Cl⁻. Après 69 h de stress, le Ψ_t des plants + Cl⁻ a diminué de 24 % (de + 0,46 MPa à + 0,35 MPa). Dans le même temps, pour le traitement - Cl⁻, le Ψ_t a diminué de 64 % (de + 0,47 MPa à + 0,17 MPa). Sous l'effet d'une contrainte hydrique, les cocotiers carencés en Cl⁻ perdent leur turgescence plus rapidement que les cocotiers non carencés en Cl⁻.

DISCUSSION

Cette étude en serre a permis de confirmer l'importance de l'ion chlorure dans la nutrition minérale du cocotier. En condition hydrique non stressante, l'ouverture stomatique s'accompagne d'une navette d'ions K⁺ et Cl⁻, des cellules subsidiaires latérales vers les cellules de garde comme cela a été décrit chez le maïs (Raschke et Fellows, 1971). En cas de carence en Cl⁻, l'absence d'influx de Cl⁻ dans les cellules de garde est compensée par un autre mécanisme qui reste à déterminer. Ce dernier est néanmoins plus lent à se mettre en œuvre, puisqu'il faut attendre 3 h d'éclairement pour mesurer des conductances équivalentes entre les deux traitements. La carence en Cl⁻ entraîne une réduction des échanges gazeux chez le cocotier durant les 3 premières heures de la journée. L'application d'un stress hydrique provoque au premier jour une fermeture stomatique (Fig. 2). Une telle fermeture ne peut se produire au champ parce que le stress hydrique est plus progressif en conditions naturelles. Ici, il résulte certainement de mouvements hydropassifs d'eau (Falk, 1966). Aux deuxième et troisième jours, on observe une réouverture qui est plus importante chez les plants + Cl⁻. En cas de stress, la carence en chlorure exerce un effet dépressif sur la conductance stomatique, toute la journée ce qui doit très vraisemblablement réduire notablement les échanges gazeux photosynthétiques.

La contrainte hydrique conduit également à une baisse des potentiels hydriques foliaires qui est plus marquée pour le traitement + Cl⁻ que pour - Cl⁻. Cette baisse est très vraisemblablement due à une diminution du potentiel osmotique. Le Ψ_s des cocotiers carencés en Cl⁻ atteint une valeur minimale de - 1 MPa, et ne semble pas pouvoir diminuer encore. Par contre, les cocotiers non carencés diminuent leur Ψ_s jusqu'à - 1,6 MPa, et semblent capables d'atteindre des valeurs inférieures (Fig. 3). En réponse à un stress hydrique relativement modéré (- 0,5 MPa), les cocotiers non carencés en Cl⁻ accumulent des osmotites de manière plus

importante que les cocotiers carencés. Il en résulte pour les plants + Cl^- un meilleur maintien de la turgescence des tissus. Ainsi après 3 jours de stress, les plants non carencés ont encore un Ψ_t qui représente 76 % du potentiel de départ, alors que chez les cocotiers carencés celui-ci n'atteint plus que 36 % de sa valeur initiale sans toutefois que la perte de turgescence soit totale (+ 0,15 MPa). La carence en chlorure provoque donc une diminution importante de la capacité d'osmorégulation du cocotier, alors que le maintien de la turgescence cellulaire est considéré comme le facteur principal de la poursuite des processus de croissance et de production en période de stress hydrique (Turner et Jones, 1980 ; Turner, 1986). Cette meilleure osmorégulation peut expliquer la réouverture plus importante des stomates, observée aux deuxième et troisième jours chez les cocotiers + Cl^- .

La carence en chlorure chez le cocotier intervient donc au moins à deux niveaux : (a) au niveau de la régulation stomatique, elle entraîne un retard à l'ouverture en début de journée. En cas de stress hydrique, elle est responsable d'une réduction de la conductance stomatique, (b) elle diminue la capacité d'osmorégulation.

L'ion chlorure paraît chez le cocotier jouer un rôle important dans la tolérance au stress hydrique. En effet, par son action sur la conductance et sur l'osmorégulation, il permet au cocotier d'optimiser l'équilibre entre transpiration et assimilation. C'est un argument pour certains résultats obtenus au champ (Braconnier et d'Auzac, 1989). La question se pose de savoir comment intervient le chlorure dans l'osmorégulation ? : (a) intervient-il en permettant, via l'ouverture stomatique, la photosynthèse et donc la production d'osmotiques ? (b) est-il lui-même un osmotique ? (c) est-il indispensable à certaine(s) réaction(s) enzymatique(s) permettant la synthèse d'osmotiques ?

Remerciements. — Nous remercions l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux qui a financé ces recherches, ainsi que la station de recherche de La Mé (IRHO Côte-d'Ivoire) pour la fourniture des plantules de cocotier in vitro. Nous remercions également M. Merlet, ingénieur des Services Communs de Microanalyse de l'USTL, pour sa coopération lors de l'utilisation de la microsonde CAMEBAX. Notre gratitude va au Dr D. Laffray pour sa lecture critique du manuscrit.

